

Agent for selective hyperthermia and chemotherapy of tumours - consists of ferromagnetic particles encapsulated in matrix which is not phagocytosed and is able to couple with antitumour agent

Publication number: DE4201461

Publication date: 1993-07-22

Inventor: MUELLER-SCHULTE DETLEF DR
(DE)

Applicant: MUELLER SCHULTE DETLEF DR
(DE)

Classification:

- international: A61K9/127; A61K9/50; A61K9/51;
A61K41/00; A61K47/48;
C07K16/28; C07K16/30;
A61K38/00; A61K9/127;
A61K9/50; A61K9/51; A61K41/00;
A61K47/48; C07K16/18;
A61K38/00; (IPC1-7): A61K9/127;
A61K9/26; A61K9/50; A61K31/70;
A61K37/02; A61K39/395
- european: A61K9/127B; A61K9/50T;
A61K9/51; A61K41/00U;
A61K47/48W8B; C07K16/28B;
C07K16/30

Application number: DE19924201461 19920121

Priority number(s): DE19924201461 19920121

Report a data error here

Abstract of DE4201461

A therapeutic agent (I) for selective tumor therapy comprises ferromagnetic particles with a Curie temp. of 42.5-70 deg.C and particle size below 500 nm encapsulated in a polymer or bipolymer matrix which is not phagocytosed by the reticuloendothelial system and which has reactive gps which couple with tumor cell targetting active ingredients. The polymer layer is of starch, polyvinyl alcohol, polyacrylanide, dextra,

agarose or gelatine. The ferromagnetic particles are themselves encapsulated in liposomes (vesicles) of phospholipids, sphingolipids, glycosphingolipids, ceramids or other substances that make up cell membranes. USE/ADVANTAGE - (I) can be used for selective hyperthermia and chemotherapy in tumor therapy. (I), unlike previous agents is able to generate sufficient heat and is also suitable for the treatment of deep-lying tumors, as the ferromagnetic particles are coupled with the cytostatic active ingredients. As the whole is then encapsulated in the polymer matrix, normal tissue does not come into direct contact with the tox

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 42 01 461 A 1**

⑤① Int. Cl. 5:
A 61 K 9/26
A 61 K 9/50
A 61 K 9/127
A 61 K 39/395
A 61 K 37/02
A 61 K 31/70

②① Aktenzeichen: P 42 01 461.1
②② Anmeldetag: 21. 1. 92
④③ Offenlegungstag: 22. 7. 93

DE 42 01 461 A 1

⑦① Anmelder:
Müller-Schulte, Detlef, Dr., 5100 Aachen, DE

⑦② Erfinder:
gleich Anmelder

⑤④ Mittel für die selektive Tumorthherapie auf der Basis ferromagnetischer Partikel - Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

⑤⑦ Ferromagnetische Partikel mit einer Curie-Temperatur zwischen 42,5 und 70°C und einer Teilchengröße von < 500 nm werden separat oder zusammen mit Tumortoxinen in eine Polymermatrix, die nicht mit dem reticulo-endothelialen System interagiert, eingekapselt. An die aktivierte Polymermatrix werden Tumorzell-Targeting vermittelnde Wirksubstanzen chemisch gekoppelt. Nach Injektion der Teilchen in den Körper eines Patienten reichern sich die eingekapselten und gekoppelten magnetischen Teilchen in und an den Tumorzellen an und können für die Therapie durch Anlegen eines äußeren Hochfrequenzwechselfeldes exakt auf die Temperatur des Curiepunktes aufgeheizt werden.

DE 42 01 461 A 1

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferromagnetische Mikropartikel mit einer Curie-Temperatur zwischen 42,5 und 70°C und einer Teilchengröße < 500 nm, die induktiv exakt bis zum Curiepunkt aufheizbar sind und alternativ in Kombination mit Tumortoxinen simultan für die selektive Hyperthermie und Chemotherapie im Rahmen der Tumorthherapie verwendet werden können.

Die heute vorwiegend praktizierten Tumorthapien stammen durchweg aus dem Bereich der Chemo- und Strahlungstherapie. Beide als klassisch zu bezeichnenden Methoden waren in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschung mit dem Ziel, durch verbesserte Medikamente bzw. Bestrahlungstechniken eine effektivere und vor allem selektivere Therapie zu erreichen, um dadurch die teilweise eklatanten Nebenwirkungen der Behandlungen zu vermindern. Trotz vielfältiger Verbesserungen stellen beide Verfahren relativ radikale Methoden dar, die bis dato kaum gestatten, zwischen gesundem und erkranktem Gewebe zu diskriminieren. Die Folge davon ist, daß die erheblichen Nebenwirkungen wie Haarausfall, Erbrechen, Schwindelanfälle etc. nach wie vor kaum beherrscht werden. Aufgrund der enormen Nachteile, die diese Verfahren mit sich bringen, hat man schon frühzeitig versucht, alternative Verfahren zu konzipieren. In diesem Zusammenhang sind die Entwicklungen im Bereich der Sauerstoffmehrschritttherapie, Übersäuerungstherapie, Immuntherapie und Hyperthermie zu nennen, die auch Eingang in die medizinische Praxis gefunden haben. Unter diesen Verfahren haben sich vor allem die Hyperthermie und Immuntherapie als erfolgversprechende Ansätze entpuppt.

Ausgangspunkt bei der Hyperthermie ist der Umstand, daß Krebszellen aufgrund ihrer höheren Stoffwechselrate wärmeempfindlicher sind als gesunde Zellen. Das bedeutet in praxi, daß die Tumorzelle bei einer künstlichen Erwärmung bereits bei einer Temperatur oberhalb 42,5°C abstirbt, während die normalen Zellen unter diesen Bedingungen überleben. Dieser Tatbestand wird nun in der Hyperthermie dadurch genutzt, daß man versucht, Tumorgewebe künstlich auf über 42°C aufzuheizen. Hierfür werden in der Praxis heiße Bäder, Behandlungen mit heißen Wachsen, Erzeugung künstlichen Fiebers sowie seit neuerem Mikrowellen, Induktionsheizung und Ultraschall herangezogen. Das Hauptproblem bei allen Hyperthermie-Behandlungen besteht darin, genügend Energie auf vor allem tieferliegende Tumorbereiche zu übertragen. Abgesehen von den teilweise erheblichen körperlichen Belastungen, die die Erwärmungen mit sich bringen, werden mit den heute zur Verfügung stehenden Heizsystemen kaum Eindringtiefen von mehr als 7 cm erreicht (JAMA, 252, 3341, 1984), so daß die tieferliegenden Tumorzellen nicht auf den Schwellenwert von > 42,5°C gebracht werden können, d. h., diese Zellen überleben unter diesen Bedingungen und können proliferieren. Um dieses Problem der ungenügenden Wärmefokussierung zu umgehen, hat man alternativ versucht, Metallnadeln operativ in den Tumorherd zu implantieren (IEEE Trans. Biomed. Eng., 31, 227, 1984), die mittels eines Radiosenders aufgeheizt werden. Zu einem Durchbruch hat diese Verfahrensweise bis dato jedoch nicht geführt. Der heutige Trend geht vielmehr dahin, Hyperthermie als adjuvantes Verfahren in Kombination mit anderen Therapien, z. B. der Chemotherapie, zu benutzen. So scheint erwie-

sen zu sein, daß Chemotherapeutika in Kombination mit der Hyperthermie eine höhere Response rate aufweisen als Cytostatika allein (Tanaka et al., Cancer J., 4, 193, 1991; Akuta et al., Int. J. Hyperthermy, 7, 231, 1991).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein neues Hyperthermieverfahren zu entwickeln, das einerseits die bisherigen Nachteile der ungenügenden Heizleistung beseitigt und andererseits zur Behandlung auch von tiefliegenden Tumoren geeignet ist.

Diese Aufgabe kann überraschenderweise durch ein Verfahren gelöst werden, das sich ferromagnetischer Partikel (FMP) bedient, die eine definierte Curie-Temperatur aufweisen. Mittel hierfür sind mikropartikuläre FMP mit einer Größe von < 500 nm, die aus einer bestimmten Legierungszusammensetzung bestehen und einen Curiepunkt zwischen 43 und 70°C aufweisen. Legierungen dieser Art sind aus der DE-OS 35 02 998 bekannt. Es handelt sich dabei um Metallegierungen des Ferrittyps der allgemeinen Formel $Me_1 - x Zn_x Fe_2 O_4$, wobei Me vorzugsweise Kobalt oder Nickel ist. Durch Variation des Kobalt- bzw. Nickelgehaltes kann der Curiepunkt genau eingestellt werden. Derartige Legierungen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung sind allgemein bekannt (J. Smit; H. P. J. Wijn, "Ferrites", Wiley, New York, 1959). Neben diesen Verbindungen können auch Legierungen des Typs $MgCrFeO_4$ verwendet werden, die Curie-Temperaturen um 50°C aufweisen.

In der DE-OS 28 28 941 werden $Fe(III)$ hydroxid- und Fe-Oxid-Teilchen mit einer Größe bis zu 1 µm beschrieben, die, in den Körper injiziert, anschließend induktiv aufgeheizt werden können. Das Ziel dort ist, mit Hilfe der induktiv aufheizbaren Partikel Wärme so selektiv auf die Tumorzellen zu übertragen, daß eine Temperatur von über 42°C erreicht wird, wodurch die Tumorzellen schließlich abgetötet werden sollen. Das beschriebene Verfahren weist eine Reihe grundsätzlicher Mängel auf und ist daher kaum geeignet, Tumorzellen selektiv aufzuheizen. Zum einen lassen sich die verwendeten Eisenverbindungen mittels der applizierten Induktionsfelder nur sehr unkontrolliert aufheizen — ein Nachteil, der in diesem physiologisch empfindlichen Bereich gravierend ist —, zum anderen dürfte es kaum möglich sein, Partikel mit einer Größe um 1 µm, intravenös appliziert, an den Ort des Tumors zu dirigieren. Die Nichtdurchführbarkeit dieses Verfahrens liegt darin begründet, daß die Blutgefäße mit einer Endothelzellschicht ausgekleidet sind, die die Diffusion solch großer Teilchen in das Körperinnere verhindern. Darüber hinaus ist das vorgeschlagene Verfahren, die Partikel mit Toxinen oder Radioisotopen zu beladen, nicht geeignet, Tumorzellen speziell aufzuspüren, da diese unspezifischen Mittel grundsätzlich nicht zwischen einer Tumorzelle und einer gesunden Zelle diskriminieren können. Ähnliches gilt auch für die dort beschriebenen Tumor-Antikörper. Die bis heute produzierten Antikörper (AK) besitzen keine 100%ige Tumorspezifität (Seiler et al., Angew. Chemie, 97, 141, 1985). Insofern ist das beschriebene Verfahren nicht, wie beansprucht, generell praktikabel. Der gravierendste Nachteil des zitierten Verfahrens besteht jedoch darin, daß keinerlei Maßnahmen angeführt oder beschrieben sind, die geeignet wären, die Phagozytose der injizierten Partikel durch das retikuloendotheliale System (RES) zu umgehen. Es ist bekannt, daß Phagozyten, speziell die Makrophagen, solche Teilchen innerhalb von Minuten eliminieren und somit unwirksam machen. Dieses fundamentale Problem ist auch bei dem in der DE-OS 35 02 998 beschriebenen Verfahren der selektiven Hyperthermie mittels FMP nicht gelöst. FMP

werden hier mit Polymeren beschichtet, an die Tumor-AK gekoppelt werden, die als carrier zum Ort des Tumors fungieren sollen. Die dabei verwendeten Teilchengrößen von 0,5–1 µm sowie die angegebenen Beschichtungen sind ebenfalls nicht geeignet, den Eliminierungsmechanismus des RES zu umgehen.

Dieser Nachteil kann überraschenderweise dadurch beseitigt werden, daß man

- a) zu sehr feinen Teilchen mit einer Größe von unter 500 nm übergeht, vorzugsweise solchen zwischen 10 und 100 nm, und
- b) diese Teilchen speziell mit solchen Polymeren bzw. bioaktiven Substanzen beschichtet, die keine Affinität zu den Makrophagen des RES aufweisen, d. h., von diesen nicht als fremd erkannt werden.

Eine weitere Maßnahme zur Umgehung der Makrophagen-Phagozytose wird durch die Verwendung der Fab- bzw. F(ab)₂-Fragmente des AK statt des intakten Moleküls erreicht, wodurch die durch das Fc-Fragment des AK vermittelte Phagozytose ausgeschaltet wird. Aus diesem Grund sind die Beschichtungen der FMP mit tumorspezifischen AK, wie in den zitierten Patentschriften beschrieben, ungeeignet, die Phagozytose des RES zu umgehen.

FMP mit einer Größe zwischen 10 und 500 nm können mit den bekannten naßtechnischen Verfahren durch Ausfällen der entsprechenden Verbindungen hergestellt werden. Solche Verfahren sind u. a. in der DE-OS 35 08 000 beschrieben. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung dieser Teilchen bietet die Plasmasprühtechnik.

Hauptanliegen der vorliegenden Erfindung ist es, FMP mit einer definierten Curie-Temperatur im Bereich zwischen 43 und 70°C so mit tumorspezifischen Substanzen zu beschichten (coat), daß sich die Teilchen nach entsprechender Injektion am Ort des Tumors anreichern und anschließend induktiv mittels eines Hochfrequenzwechselfeldes auf oberhalb 42,5°C aufgeheizt werden können. Ein weiteres Ziel besteht darin, bei der Präparation der FMP diese mit Tumortoxinen so zu kombinieren, daß sie simultan für die Tumorthherapie angewendet werden können.

Es hat sich gezeigt, daß der Prozeß der Phagozytose überraschenderweise durch Beschichten der FMP mit biokompatiblen Polymeren, inerten Proteinen oder Polysaccharid-Derivaten umgangen werden kann. Für die Beschichtung mit biokompatiblen Polymeren haben sich grundsätzlich drei Verfahren als vorteilhaft erwiesen:

- A) Liposomentechnik,
- B) Plasmapolymersation und
- C) Phasen-Separations-Suspensions-Polymerisation (PSSP).

Die Liposomen-Technik ist seit geraumer Zeit als alternative Methodik für die Applikation besonders von cytotoxischen Agenzien Gegenstand diverser Entwicklungen. Das Hauptanliegen dabei ist, die Toxizität der Medikamente durch den Einschluß in Liposomen, die in der Regel aus einer Phospholipid-Doppelschicht bestehen, zu reduzieren. Bei den hierfür benutzten Lipiden handelt es sich vorwiegend um Glycerin-3-phosphat-Derivate sowie N-Acetylneuraminsäure-verknüpfte Phospholipide, desgleichen Sphingosin- und Ceramid-Derivate, die allesamt Konstituenten der natürlichen

Zellmembran sind. Man hat in der Vergangenheit zeigen können (Fendler und Romero, Life Sci., 20, 1109, 1977), daß mit Hilfe der Liposomen nicht nur unerwünschte Nebenreaktionen der Toxine besser beherrscht werden können, es wird auch beschrieben, daß durch Änderung der Liposomenmembran deren Anwendung in vielfacher Weise erweitert werden kann. Der physikalische Zustand der Membran wie Größe, Ladung und Fluidität sowie die Zusammensetzung der Membran bestimmen den Mechanismus der Liposomeninkorporation in die Zielzelle, seine "Clearance"-Rate sowie ihre Verteilung im Körper nach der Injektion. So werden neutrale Liposomen vorzugsweise von der Leber, der Milz und der Niere aufgenommen, während positiv geladene Liposomen mehr in der Lunge, negativ geladene vorwiegend in der Milz und im Knochenmark abgelagert werden. Im Hinblick auf die erfindungsgemäßen Mittel in Form der Ferromagnetika kann jetzt gezeigt werden, daß durch Zugabe einer wäßrigen Suspension der FMP zu den festen Lipiden nach anschließender Homogenisierung, z. B. im Ultraschallbad, die FMP überraschenderweise in die gebildeten Liposomen inkorporiert werden. Auch der kombinierte Einschluß von Toxinen und FMP in die Liposomen ist durch einfache Zugabe der letzteren zu der wäßrigen Suspension im Fall wasserlöslicher Toxine oder einer Chloroform-Suspension für die Applikation apolarer Toxine möglich. Die Konzentration der eingekapselten Pharmaka kann erfahrungsgemäß durch Variation der Lösungsmittelvolumina in den Liposomen sowohl für apolare als auch für polare Toxine in der Weise gesteuert werden, daß generell mit steigendem Volumen auch die Menge der inkorporierten Toxine erhöht wird. Die Stabilität der Liposomen in bezug auf die Phasenübergangstemperatur kann durch Zugabe von Co-Lipiden in Form geladener Spezies und vor allem durch Zugabe von Cholesterin gesteigert werden. Das molare Verhältnis einer solchen zusammengesetzten Membran beträgt in der Regel 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, für eine Lipid-Cholesterin-Membran vorzugsweise 9 : 1 sowie vorzugsweise 7 : 2 : 1 im Falle einer ternären Membran aus geladenen Lipidanteilen und Cholesterin. Die Freisetzung der in den Liposomen eingekapselten Substrate ist unmittelbar von ihrem physikalischen Zustand, insbesondere der flüssigkristallinen-Phasen-Übergangstemperatur bestimmt. Unterhalb dieser Übergangstemperatur befindet sich die Membran in einem "festen" und oberhalb in einem "fluiden" Zustand. Dieser Zustand bestimmt nun die Freisetzungsgeschwindigkeit ("releasing rate") der eingekapselten Toxine derart, daß nahe der Übergangstemperatur die Diffusion der Pharmaka ansteigt. Dieser Sachverhalt kann in Verbindung mit den erfindungsgemäßen Mitteln überraschenderweise dazu genutzt werden, das "drug releasing" mit Hilfe der miteingekapselten FMP direkt zu beeinflussen. Durch die induktive Aufheizung wird parallel mit Erreichen der Curie-Temperatur auch die Übergangstemperatur vom Gel zur flüssigkristallinen Phase überschritten, wodurch die Toxine unmittelbar freigesetzt werden.

Während die so präparierten Liposome vorzugsweise in die Leber, die Niere und die Milz transportiert und daher im Falle eines Tumors dieser Organe auch dort zur Behandlung eingesetzt werden können, ergibt sich durch Einsatz solcher Lipide, die über eine Zuckerfunktion oder ander aktivierbare Substituenten verfügen, überraschenderweise die Möglichkeit eines gezielten Zell-Targetings. Beispiele für diese aktivierbaren Derivate sind Glykosphingolipide, Sphingosine oder Ceramid-Derivate. Über die Hydroxyl- bzw. Aminofunktion

nen der Substituenten lassen sich nach entsprechender Aktivierung mit den bekannten Kupplungsagenzien, wie z. B. BrCN, Hexamethylen-diisocyanat oder 1,4-Butandiol-diglycidyläther (weitere Beispiele s. Ausführungen im unteren Teil dieser Erfindung), Tumor-AK oder 5 ander Wirksubstanzen durch einfache Inkubation bei Raumtemperatur bzw. 4°C kovalent koppeln. Bei der anschließenden Erzeugung der Liposomen wird so vorgegangen, daß die gekoppelten Lipide den oben beschriebenen Lipidansätzen in einer solchen Konzentration zugemischt werden, daß pro Liposom 1 bis 5, vorzugsweise 1 bis 2 Wirksubstanz-Moleküle in die Membran eingebaut werden.

Die Beschichtung der FMP mittels der Plasmapolymersation kann nach den bekannten Verfahren, wie sie in der Literatur beschrieben sind (Bell, Shen, Hrsg., "Plasma Polymerisation", ACS Symp. ser. 108, American Chem. Soc., Washington, 1979; Yasuda, J. Polym. Sci.: Macromol. rev., 16, 199, 1981), erfolgen. Die Erzeugung des Plasmas kann wahlweise mittels Gleichstrom- und Niederfrequenz-Glimmentladung, Mikrowellenentladung, Coronaentladung oder Hochfrequenz- bzw. Radio-Glimmentladung bewerkstelligt werden. Durch Variation bestimmter Verfahrensparameter wie Gasdurchflußrate, Druck, Verdünnungsgrad des Monomeren mit dem Trägergas, elektrische Leistung, Elektrodenanordnung können die Plasmamparameter wie Gas-teilchendichte, Verweilzeit des Plasmas, e-Dichte etc., die die Art und Weise der Polymerbeschichtung bestimmen, entsprechend den Anforderungen für den therapeutischen Einsatz angepaßt werden. Es können Polymerschichten von 5 bis 200 nm erzeugt werden, wobei Schichtdicken zwischen 10 und 50 nm vorzuziehen sind, da dünnere Schichten rascher biologisch abgebaut werden können als dickere. Als Substrate für die Beschichtung kommen grundsätzlich solche Substanzen bzw. Polymere in Frage, die nicht oder nur wenig mit den Blutbestandteilen oder dem RES interagieren. Monomere bzw. die daraus gebildeten Polymere, die sich hierfür eignen, sind z. B. 2-Hydroxyäthyl-methacrylat, N-Vinylpyrrolidon, 2-Hydroxyäthyl-acrylat, Glycidyl-acrylat, Glycidyl-methacrylat. Besonders gute Biokompatibilitäten werden überraschenderweise durch die Verwendung von Monomermischungen des 2-Hydroxyäthyl-methacrylats mit N-Vinylpyrrolidon erzeugt (Kirkpatrik, Müller-Schulte et al., Cells & Mat., 1, 93, 1991).

Die Beschichtung der FMP nach dem PSSP-Verfahren (Variante C) wird vorzugsweise mit Polyvinylalkohol, Stärke, Gelatine oder Acrylamid bewerkstelligt. Nach einem bekannten Verfahren (Holzschärer et al., Colloid und Polymer Sci., 265, 1067, 1987) werden Polyacrylamid-Mikroemulsionen durch Suspension einer wäßrigen Lösung von Acrylamid und Na-Acetat in einer Mischung aus Paraffinöl und Emulgator erhalten. Die gebildeten Polymerpartikel weisen eine Größenverteilung, je nach Versuchsbedingungen, zwischen 80 und 150 nm auf. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß durch Zugabe von 10 bis 80 nm großen FMP zu der Suspension diese in die Polyacrylamid-Matrix eingekapselt werden. Diese Art der Beschichtung wird praktisch nicht vom RES als fremd erkannt. In ähnlicher Weise kann die Einkapselung der FMP auch mit Polyvinylalkohol (PVA) vorgenommen werden. Hierzu wird eine Mineralsäure enthaltende wäßrige PVA-Lösung, in der die FMP suspendiert sind, in eine Pflanzenöl-Phase eingetragen und durch Zugabe von Glutaraldehyd vernetzt. Durch Zugabe z. B. von 0,5 bis 1 Gew.-% Na-Dodecylsulfat, bezogen auf die Polymer-Phase, werden PVA-be-

schichtete Teilchen mit einem Durchmesser von 50 bis 500 nm erhalten. Als organische Phase können herkömmliche Öle wie Leinsamenöl, Olivenöl, Sonnenblumenöl, Rapsöl, Sojaöl etc., ferner Paraffinöl sowie bei 5 Zimmertemperatur flüssige gesättigte und ungesättigte Fettsäure sowie deren Mischungen verwendet werden. Die Größe der PA-gecoateten Partikel wird dabei, außer von der vorgegebenen Größe der FMP, durch die Rührgeschwindigkeit, die Emulgatorkonzentration und die Viskosität der PVA-Phase bestimmt. Die Viskosität der Polymer-Phase, die vorzugsweise zwischen 1 und 12 Centipoise liegt, kann direkt durch die mittlere Molmasse des PVA sowie dessen Konzentration, die vorzugsweise zwischen 1 und 2,5 Gew.-%, bezogen auf die wäßrige Phase, beträgt, eingestellt werden, wobei mit sinkender Viskosität die Teilchengröße bzw. Dicke der Beschichtung abnimmt.

Eine alternative Einkapselung der FMP mit PVA ohne Zugabe eines Vernetzers kann nach einem bekannten Verfahren (Müller-Schulte, DE-OS 39 00 945) in der Weise durchgeführt werden, daß einer in Äthylenglykol oberhalb von 100°C gelösten PVA-Phase FMP zugemischt werden und diese Mischung in Pflanzenöl analog obigem Verfahren suspendiert wird. Der Suspensionsvorgang wird vorzugsweise in einem Ultraschallbad oder mittels eines Vortexrührers durchgeführt. Beim Abkühlprozeß erstarrt die PVA-Phase zu submikroskopischen festen perlförmigen Partikeln, deren Größe von der Viskosität sowie der Art der Homogenisierung der Suspension abhängt. Die Konzentration des PVA in der gelösten Phase beträgt allgemein 1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 0,5 bis 2,5 Gew.-%. Die Viskosität der PVA-Phase wird durch die Konzentration des gelösten PVA sowie die Temperatur der Polymer-Phase festgelegt. Die Emulgatorkonzentration beträgt in der Regel 1 bis 5 Gew.-%, bezogen auf die Polymer-Phase.

In ähnlicher Weise wie PVA kann für die Einkapselung der FMP auch Stärke verwendet werden. Hierzu wird ein in FEBS Letters, 102, 112, 1979, beschriebenes Verfahren in modifizierter Form genutzt. Stärke wird zunächst in der Hitze in Wasser gelöst und mit den FMP intensiv vermischt. Diese Mischung wird in einer Pflanzenöl-Phase, in der 1 bis 5% Emulgator gelöst sind, unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades suspendiert. Beim Abkühlen der Suspension auf Raumtemperatur fallen perlförmige Partikel an, deren Durchmesser, je nach Konzentration der Stärke und des Emulgators, zwischen 50 und 300 nm variiert. Nach dem gleichen Verfahren läßt sich auch Gelatine für die Beschichtung verwenden. Die nach der PSSP-Technik hergestellten Teilchen bieten den Vorteil, daß die Polymermatrix nach der Anreicherung im Tumor enzymatisch abgebaut und leicht aus dem Körper ausgeschieden werden kann.

Neben der Ausschaltung des RES durch die oben beschriebenen Coating-Maßnahmen spielt bei den erfindungsgemäßen Mitteln und Verfahren die zielgerichtete Applikation der FMP eine essentielle Rolle. Die bis heute verwendeten Cytostatika rufen allesamt mehr oder weniger starke Nebenwirkungen hervor und können, wie bereits hervorgehoben, grundsätzlich nicht zwischen normalen und Tumorzellen unterscheiden. Es sind daher seit einigen Jahren Bestrebungen im Gange, die Toxine dadurch gezielter einzusetzen, daß man sie an tumorspezifische bzw. -assoziierte AK kovalent bindet, um sie so als "carrier" zum Ort des Tumors zu benutzen. Der Nachteil dieser Verfahren besteht darin, daß die Cytostatika-AK-Konjugate in den Zellkern gelan-

gen müssen, um dort ihre Wirkung voll zu entfalten. Dies wird jedoch häufig dadurch verhindert, daß nach der Endozytose die Toxin-AK-Konjugate in die Lysosomen gelangen und dort enzymatisch abgebaut werden. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der entsprechenden Freisetzung des Toxins, d. h., in der entsprechenden Abspaltung des Toxins vom Konjugat in den Phagosomen. Dies stellen bis heute kaum beherrschte Probleme dar, ein Grund, weshalb diese Methodik trotz intensiver Bemühungen nur sehr vereinzelt Eingang in die medizinische Praxis gefunden hat.

Dieser Nachteil kann nun durch die erfindungsgemäßen Verfahren und Mittel überraschenderweise dadurch umgangen werden, daß man die Cytostatika kombiniert mit den FMP anwendet, derart, daß FMP und Toxin zusammen in eine Polymermatrix eingekapselt werden. Hierdurch ist sowohl die selektive Hyperthermie als auch eine simultane Chemotherapie realisiert. Die obenerwähnten Nachteile der Toxin-Konjugate sind einerseits durch die Applikation des ungebundenen freien Toxins umgangen, andererseits können aufgrund der Einkapselung gegenüber den herkömmlichen Methoden höhere Toxin-Konzentrationen gewählt werden, da normales Gewebe aufgrund der Einkapselung nicht direkt mit dem Toxin in Kontakt kommt.

Nachdem durch die beschriebenen Coating-Verfahren das RES umgangen werden kann, besteht der nächste Schritt darin, die beschichteten FMP mit solchen Tumor-AK bzw. Wirksubstanzen zu beladen, die einen gezielten Transport der Teilchen an den Ort des Tumors gewährleisten. Zu diesen AK gehören solche, die gegen eine Reihe von tumorassoziierten Antigenen gerichtet sind. Diese Antigene werden von bestimmten Tumoren verstärkt produziert und können sowohl auf der Zelloberfläche als auch in den Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Beispiele hierfür sind carcinoembryonales Antigen (CEA), α -Fetoprotein, Choriogonadotropin, β_2 -Mikroglobulin und Prostata-Phosphatase. Da diese Antigene nicht absolut tumorspezifisch sind, sondern auch im normalen Gewebe vorkommen, wurden sie bis heute lediglich für die Tumor-Diagnostik als Marker verwendet. Die erfindungsgemäßen Mittel und Verfahren ermöglichen es nun, AK gegen diese Tumor-Marker auch für die Therapie zu nutzen. Dies wird überraschenderweise dadurch möglich, daß mit Hilfe der Curie-Punkt-Methode die FMP und dementsprechend die Zellen exakt auf eine Temperatur von 42,5°C aufgeheizt werden können, d. h., selbst normale Zellen, die mit den FMP-AK-Konjugaten beladen und ebenfalls aufgeheizt werden, bleiben im Gegensatz zu den wärmeempfindlichen Tumorzellen intakt. Das vorliegende Verfahren bietet daher zwei fundamentale Vorteile gegenüber früheren Methoden: Zum einen können tumorassoziierte AK für eine Therapie verwendet werden, zum anderen wird eine wesentlich bessere Diskriminierung zwischen kranken und intakten Zellen ermöglicht.

Neben den obenerwähnten AK gibt es eine Reihe weiterer AK, die sich als tumorspezifisch bzw. tumorassoziiert herausgestellt haben und sich bis zu 80% im Tumor anreichern können (UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, A. Liss, Hrsg., New York, Vol. 27, 1985). Hierzu zählen z. B. AK gegen Fibrin, colorectales Antigen (CA 19-9) (Koprowski et al., Science, 212, 53, 1981), Ca 125-Determinanten in Epithel Ovarialcarcinoma, Melanom-assoziierte Antigene wie Chondroitin Sulfat Proteoglycan und Disialogangliosid (GD2, GD3) oder Human T-Zellen 3A1 Antigen.

Aus in vivo Studien geht hervor (UCLA Symposium

on Molecular and Cellular Biology, vol. 27, pp 523), daß die Reaktivität der AK gegen diverse Tumore stark variiert. Ein 2-139-AK reagiert z. B. stark gegen Colon- und Prostata-Carcinome, während er gegen Tumore der Lunge und des Pankreas wesentlich geringere Reaktivitäten aufweist. Die vorliegenden Verfahren können daher vor allem bei solchen Tumoren erfolgreich eingesetzt werden, gegen die eine hohe Reaktivität zu erwarten ist.

Bei der Kopplung der AK an die FMP werden, wie bereits erwähnt, vorzugsweise die Fab- oder F(ab')₂-Fragmente des AK verwendet, die nach bekannten Verfahren durch enzymatische Spaltung mit Papain bzw. Pepsin erhältlich sind. Die Verwendung dieser Fragmente gegenüber dem kompletten Molekül bietet den Vorteil, die durch das Fc-Fragment des AK vermittelten Reaktionen wie die Phagozytose, Komplementaktivierung oder Thrombozytenaktivierung auszuschalten. Darüber hinaus können die beiden Fragmente wesentlich besser als das komplette Molekül in das Gewebe penetrieren, woraus ein verbessertes und rascheres Targetin resultiert.

Eine alternative Möglichkeit der Kopplung der Tumor-AK an die FMP unter Verwendung des intakten Moleküls ergibt sich überraschenderweise durch die Kopplung über die Zuckerliganden des Fc-Fragmentes. Dafür werden im ersten Schritt durch Oxidation mit Perjodat in saurer Lösung Aldehydfunktionen in die Zuckerliganden eingeführt. An diese Gruppen können im zweiten Schritt FMP, die eine Hydrazidgruppe tragen, kovalent gebunden werden. Die Fc-Region des AK ist dadurch automatisch blockiert und kann nicht mehr von den Rezeptoren der Makrophagen erkannt werden. Die Oxidation der Hydroxylgruppen der Oligosaccharid-Substituenten geschieht durch einfache Inkubation des AK in eine 1 bis 15 mM, vorzugsweise 4 bis 10 mM Na-Perjodat enthaltende Na-Acetat-Pufferlösung, pH 5–6, über einen Zeitraum von 30 bis 60 Min. bei 4°C. Die Hydrazidfunktionen werden beispielsweise durch Reaktion von Adipinsäuredihydrazid mit den Epoxygruppen der z. B. mit Glycidylmethacrylat beschichteten FMP durch einfaches Inkubieren bei Raumtemperatur eingeführt.

Eine interessante Variante für das Zelltargeting und die Tumorthherapie eröffnet sich durch die Verwendung heterobispezifischer AK. Diese seit geraumer Zeit verwendeten künstlichen Hybridantikörper sind aus zwei verschiedenen Immunglobulinen aufgebaut und können simultan gegen die Epitope zweier unterschiedlicher Antigene gerichtet sein. Die Herstellung dieser Spezies ist in den letzten Jahren beschrieben worden (Nature, 314, 628, 1985; Clin. Exp. Immunol., 79, 315). Mit Hilfe dieser Hybridantikörper lassen sich die FMP zusätzlich mit einer Reihe anderer Therapieverfahren kombinieren. Durch Kopplung der bifunktionellen AK mit Spezifitäten sowohl gegen Tumorzellen als auch z. B. gegen Radionuklide, Toxine, cytotoxische Zellen oder CD3-, CD16-Effektor-Zellen, Streptavidin, Avidin, Biotin kann die Effizienz der FMP durch die dadurch zusätzlich vermittelte Zellzerstörung überraschenderweise deutlich gesteigert werden. Für die Bindung der heterobifunktionellen AK an die polymerbeschichteten FMP kommen grundsätzlich die gleichen Kopplungsverfahren wie für die herkömmlichen AK oder AK-Fragmente in Frage (nähere Ausführungen s. unten). Vorzugsweise werden pro FMP 2 bis 5 bifunktionelle AK gekoppelt.

In den letzten Jahren hat sich mehr und mehr herauskristallisiert, daß maligne Transformationen mit Struk-

turveränderungen der Glykoproteine und Lectine auf der Zellmembran einhergehen. Es wird sogar diskutiert, daß die Interaktionen von Glykokonjugaten mit den veränderten Lectinrezeptoren eine wesentliche Rolle bei der biologischen Information, der Zellwachstumsregulation und Differenzierung (z. B. der Metastasenbildung) spielen. Diese Erkenntnis eröffnet neue Ansätze auch für das Tumorzell-Targeting. Durch Einsatz von Proteinen wie z. B. Human-Serum-Albumin, die nach bekannten Verfahren mit einem Zuckerliganden wie z. B. Lactose, Asialofetuin, Melibiose, Mannan, Fucose, Mannose, Glucose, Rhamnose, Sialinsäure, Mannose-6-Phosphat, Xylose, N-Acetyl-D-Glucosamin oder Galactose gekoppelt werden, können Tumorzellen gezielt markiert werden. Diese Technik wurde in der Vergangenheit zur Differenzierung von Tumorzellen, u. a. der Lunge, des Colons, der Murin-Lymphome oder der Testikel, herangezogen. Mit Hilfe dieser sogenannten Neoglykoprotein-Technik läßt sich überraschenderweise ein ähnliches Zelltargeting realisieren wie mit den Tumor-AK.

Die für die jeweiligen Tumore spezifischen Liganden werden zunächst in vitro mit Hilfe der Zell-Affinitäts-Chromatographie ermittelt. Zu diesem Zweck werden Zuckerliganden zunächst an eine Polymermatrix, so wie sie heute üblicherweise in der Säulenchromatographie verwendet wird, gekoppelt. Anschließend wird die betreffende Tumorzellsuspension mit dem Affinitätsharz inkubiert. Besteht nun eine hohe Affinität zwischen dem Liganden und der zuckerbindenden Struktur, also dem Lectin der Tumorzelle, so kommt es zu einer festen Bindung zwischen Festphase und Tumorzelle. Normale Zellen werden dabei nicht gebunden und können eluiert werden. Die ermittelten Liganden können direkt für das Tumorzelltargeting der FMP eingesetzt werden, indem sie entweder, wie oben beschrieben, über ein inertes Protein (z. B. Human Serum Albumin) oder über ein Spacermolekül, wie es in der herkömmlichen Affinitäts-Chromatographie üblich ist, an das polymergecoatete FMP gekoppelt werden.

Neben AK und Neoglykoproteinen wird durch die Verwendung des Blutdruckmittels Angiotensin II eine zusätzliche Möglichkeit zum Tumortargeting eröffnet. In-vivo-Studien (Goldberg et al., Brit. J. Cancer, 64, 114, 1991) haben ergeben, daß bei colorectalen Tumoren Metastasen durch Applikation von Angiotensin II injizierte Mikropartikel sehr viel besser vom Tumor aufgenommen werden als ohne Angiotensin-Gabe. Dieser Sachverhalt kann überraschenderweise dazu genutzt werden, ein verbessertes Zelltargeting der FMP dadurch zu erreichen, daß das Octapeptid Angiotensin II direkt an die FMP kovalent gekoppelt wird. Auch hierbei kommen die üblichen Immobilisierungs-Methoden, wie noch näher zu erläutern sein wird, zur Anwendung.

Eine deutliche Verbesserung des Zelltargetings für die FMP ergibt sich überraschenderweise durch die Verwendung der Biotin/Streptavidin- bzw. Avidin-Reaktion. Seit geraumer Zeit wird die hohe Bindungsaffinität zwischen Biotin und dem Protein Streptavidin (oder Avidin) in der Molekularbiologie zur Auftrennung von Nukleinsäuren und Proteinen genutzt. Dieses System läßt sich nun in hervorragender Weise für das Zelltargeting nutzen. Bei Tumoren, insbesondere dem Mammacarcinom, wurde eine verstärkte Bildung der Rezeptoren für den Epidermal Growth Factor (EGF) nachgewiesen. Dieser Sachverhalt kann wie folgt für das Tumorzelltargeting genutzt werden: Die erste Möglichkeit besteht darin, Biotin nach den bekannten Methoden (Guigni

et al., J. Cell Biology, 104, 1291, 1987) über das N-biotinyl-N-Hydroxysuccinimid an den EGF zu koppeln, wobei vorzugsweise ein Biotin-Molekül pro EGF immobilisiert wird. Nach Injektion des biotinylierten EGF wird dieser vom EGF-Rezeptor der Tumorzelle fest gebunden. Im nächsten Schritt erfolgt die Bindung der applizierten Streptavidin gekoppelten FMP an das Biotin-EGF-EGF-Rezeptor-Konjugat. Eine weitere Möglichkeit, das Streptavidin-Biotin-Prinzip zu nutzen, ergibt sich anhand der bekannten Tumor-AK. Hierbei wird zunächst ein nach bekannten Verfahren (z. B. Schechter et al., Int. J. Cancer, 48, 167, 1991) biotinylierter Tumor-AK appliziert. Nachdem sich der Biotin-AK am Ort des Tumors angereichert hat, werden die FMP, an die zuvor Streptavidin kovalent gebunden wurde, injiziert. Es resultiert schließlich eine feste Bindung zwischen biotinyliertem AK und Streptavidin-FMP.

Die Kopplung der beschriebenen bioaktiven, das Tumorzelltargeting vermittelnden Substanzen wie Tumor-AK, Zuckerliganden, Oligosaccharide, Glykoproteine, Lectine, Streptavidin, Avidin oder Biotin an die polymerbeschichteten FMP geschieht nach den bekannten Verfahren zur Immobilisierung von Biomolekülen an polymere Träger (Methods in Enzymology, Mosbach Hrsg., Vol. 135, 3—170, 1987). Als Kopplungsmedien kommen grundsätzlich solche Agenzien in Frage, die sich bei der Präparation von Affinitätsharzen bewährt haben. Hierzu zählen z. B. Bromcyan, Hexamethyldiisocyanat, Tosylchlorid, Tresylchlorid, 2-Fluor-1-methylpyridinium-toluol-4-sulfonat, Epichlorhydrin, N-Hydroxysuccinimid, Chlorcarbonat, Isonitril, Hydrazide, Glutaraldehyd, 1,1'-Carbonyldiimidazol oder 1,4-Butandiol-diglycidyläther.

Für die Applikation der FMP allein hat es sich als vorteilhaft erwiesen, aus sterischen Gründen pro FMP ein bis zwei Tumor-AK, AK-Fragmente oder andere, Targetin vermittelnde Proteine zu koppeln. Für die niedermolekularen Zuckerliganden bestehen dagegen keinerlei Beschränkungen.

Da aufgrund des erhöhten Stoffwechsels Tumorzellen stärker zur Endocytose neigen als normale Zellen, ist allein aufgrund dieses Mechanismus die Möglichkeit gegeben, alternativ zu den bisher beschriebenen Verfahren die FMP auch ohne irgendein Polymercoating und ohne Kopplung eines Tumor-Carriers selektiv an die Tumorzelle heranzubringen. Wie allgemein bekannt, werden körperfremde Substanzen, nachdem sie in den Körper gelangt sind, sehr rasch — innerhalb von Minuten — vom RES phagozytiert. Dieser Prozeß kann überraschenderweise für die erfindungsgemäßen Mittel und Verfahren dadurch genutzt werden, daß man die unbeschichteten FMP intravenös injiziert. Der dadurch ausgelöste Phagozytose-Mechanismus bedingt, daß die FMP vorwiegend in der Leber, der Niere und der Milz abgelagert werden. Im Falle eines Tumors dieser Organe werden sich die FMP nach der Injektion dort anreichern und infolge der erhöhten Endozytoserate vorwiegend in den Tumorzellen dieser Organe einlagern.

Neben der Verwendung heterobispezifischer, partiell gegen Tumoreffektoren gerichtete AK zur Verstärkung der Anti-Tumorstoffwirkung der FMP, trägt ein zusätzliches Verfahren bei, das es ermöglicht, die mittels FMP vermittelte Hyperthermie mit dem therapeutischen Prinzip der Immuntoxine so zu kombinieren, daß überraschenderweise ein integrales Therapieverfahren realisiert wird. Beide Methoden, die in der Praxis durch Kombination zweier separater Therapien heute schon angewendet werden, können mit Hilfe der FMP-Technik simul-

tan in einem Therapieschritt durchgeführt werden. Dazu werden die heute allgemein in der Tumorthherapie verwendeten Toxine bzw. Cytostatika, wie z. B. Ricin, Diphtherie-Toxin, Methotrexat, Daunomycin, Cis-Platin, Doxorubicin, Adriamycin, Abrin etc., während der Phasenseparations-Suspensionspolymerisation zusammen mit den FMP zugegeben. Dabei werden überraschenderweise nicht nur die FMP, sondern auch die Toxine in die Polymermatrix eingelagert. Als Polymermatrix werden hierfür vorzugsweise PVA, Gelatine oder Stärke verwendet. Auch mittels der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Liposomen-Technik kann eine kombinierte Einkapselung bewerkstelligt werden. Zu diesem Zweck wird eine Toxine bzw. Cytostatika, FMP, Phospholipide und Tumor-AK enthaltende wäßrige Suspension in einem Ultraschallbad so homogenisiert, daß Teilchengrößen zwischen 200 und 500 nm entstehen. Die Konzentration der zugefügten Phospholipide, Toxine und FMP wird so eingestellt, daß pro Liposom ein FMP und 5 bis 10 niedermolekulare Toxin-Moleküle sowie maximal 5 Protein-Toxin-Moleküle (z. B. Ricin, Abrin, Diphtherie-Toxin) eingekapselt werden. Nach Anreicherung der FMP-Toxin-Teilchen im Tumor kann sich durch Anlegen eines äußeren hochfrequenten Wechselfeldes sowohl das hyperthermische als auch das cytotoxische Prinzip gleichzeitig entfalten. Durch Variation der Porosität der Polymermatrix (z. B. PVA), die sowohl mit Hilfe der zur Einkapselung verwendeten Polymerkonzentration als auch durch die Konzentration des zugesetzten Vernetzers genau eingestellt werden kann, läßt sich die Diffusion der Toxine in die Tumorzelle gezielt im Sinne einer Langzeit- oder Kurzzeittherapie steuern. Hohe Polymerkonzentrationen sowie niedrige Molekulargewichte in Verbindung mit hoher Vernetzerkonzentration führen in der Regel zu geringer Porosität und damit niedriger Diffusionsrate. Aus einem hohen Molekulargewicht (> 150 000) und einer niedrigen Vernetzerkonzentration resultieren dagegen erhöhte Diffusionsraten. Kombinationen der verschiedenen Versuchsparameter sind auch möglich und richten sich nach den jeweiligen Anforderungen der Praxis.

Die Hauptproblematik bei den gegenwärtigen Immunotoxinen besteht darin, daß infolge der labilen Verknüpfung zwischen Toxin und Tumor-AK das Konjugat einem enzymatischen Abbau sowohl außerhalb als auch innerhalb der Zelle unterworfen ist. Dies hat zur Folge, daß das Toxin-Targeting erheblich beeinträchtigt und letztlich die für den Zelltod erforderliche letale Toxin-Dosis am Wirkort nicht mehr realisiert ist. Dieser Nachteil wird überraschenderweise durch den Einsatz der FMP-Toxin-Kolloide dadurch umgangen, daß das isolierte Toxin sofort und nicht erst nach der notwendigen Bindungsspaltung des AK-Toxin-Konjugates wirksam werden kann. Hierdurch läßt sich die Konzentration an Toxin gegenüber früheren Verfahren für die Therapie deutlich steigern. In der Regel genügen 5 bis 10 Toxin-Moleküle pro Zelle zur Abtötung.

Die Applikation der FMP oder der FMP-Toxin-Kombinationskolloide kann je nach den medizinischen Erfordernissen und Gegebenheiten mittels subkutaner, intravenöser, intraarterieller, intraperitonealer, intralymphatischer oder direkter Injektion in den Tumorherd erfolgen. Die Menge der injizierten Teilchen richtet sich erfahrungsgemäß nach dem jeweiligen Tumolvolumen.

Die Geometrie und Leistung des Induktionsgerätes richtet sich nach den Erfordernissen der zu behandelnden Körperbereiche. Im Falle tiefliegender Tumore wird vorzugsweise eine Induktionsspule von 40 bis

70 cm Durchmesser verwendet, in die der Körper des Patienten hineingeschoben werden kann. Die Spule ist an einen herkömmlichen Hochfrequenzgenerator angeschlossen, dessen Leistung im Bereich von 0,1 bis 1 kW liegt. Die einstellbare Frequenz liegt im Bereich von 0,5 bis 10 MHz, wobei für die Praxis vorzugsweise eine solche von 0,5 bis 2 MHz verwendet wird. Bei diesen Frequenzen wird die gesamte Energie auf die FMP übertragen. Gesundes Gewebe wird im Gegensatz zu den heute gebräuchlichen Techniken innerhalb der Hyperthermie wie Mikrowelle, Ultraschall oder Induktionsheizung, nicht erfaßt. Die Stärke des angewandten Magnetfeldes liegt in der Regel zwischen 400 und 800 A/m.

Die erforderlichen Behandlungszeiten richten sich nach den jeweiligen therapeutischen Erfordernissen und liegen üblicherweise zwischen einigen Minuten bis hin zu mehreren Stunden. Auch eine Intervall-Behandlung über einen längeren Zeitraum hinweg ist möglich, wobei ein genaues "Monitoring" der FMP im Körper angezeigt ist.

Die Erfindung wird im folgenden anhand einiger Beispiele näher beschrieben.

Beispiel 1

0,1 g einer $\text{Ni}_{0,2}\text{Zn}_{0,8}\text{Fe}_2\text{O}_4$ -Verbindung mit einer Curie-Temperatur von 43°C und einer mittleren Teilchengröße von 50 nm werden mit 7,5 ml einer wäßrigen PVA-Lösung ($M_w = 150\,000$), der 100 mg Na-Dodecylsulfat, 0,5 ml 1N HCl und 0,1 ml 25%iges Glutaraldehyd zugegeben werden, in 25 ml Leinsamenöl suspendiert und 5 Min. in einem Ultraschallbad (100 W) beschallt. Danach wird die Suspension für 15 Min. bei Raumtemperatur bei 2000 U/Min. mittels eines herkömmlichen Rührwerks weitergerührt. Anschließend wird die Suspension mehrfach mit jeweils 30 ml n-Hexan extrahiert, bis die wäßrige Phase ölfrei ist, daran schließt sich eine weitere Extraktion mit Diäthyläther an. Durch 15minütiges Zentrifugieren ($4000 \times g$) sowie 24stündige Dialyse gegen Wasser wird das Produkt von noch gelöstem Polymer, Vernetzer und Fremdionen befreit. Es folgt eine 12stündige Vakuumtrocknung über Phosphorpentoxid. Das getrocknete Produkt wird sodann mit 3 ml absolutem Dimethylsulfoxid (DMSO), in dem 0,5 ml Hexamethyldiisocyanat und 20 µl Zinn-octoat gelöst sind, versetzt und unter Schütteln 30 Min. bei 40°C umgesetzt. Mittels eines Magneten wird das umgesetzte Produkt aus der Reaktionslösung entfernt und durch mehrfache abwechselnde Suspension in 20 ml Dimethylformamid und 20 ml Aceton und anschließendes Dekantieren unter jeweiliger Anwendung des Magneten gereinigt. Danach wird das Produkt im Vakuum (1300 Pa) über KOH 5 Stunden getrocknet.

0,1 mg eines in PBS-Puffer, pH 7,0, gelösten monoklonalen AK, der gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist (Schlechter et al., Int. J. Cancer, 48, 167, 1991), wird durch 6stündige Inkubation bei Raumtemperatur an die aktivierten FMP kovalent gekoppelt. Das immobilisierte Produkt wird 20 Min. bei $4000 \times g$ zentrifugiert und der Überstand anschließend lyophilisiert. Das gewonnene Produkt wird in 3 ml physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und sterilfiltriert. Die Suspension kann so für eine direkte Applikation verwendet und nach Anreicherung im betreffenden Tumor durch Anlegen eines 2-MHz-Wechselfeldes auf die festgelegte Curie-Temperatur aufgeheizt werden.

Beispiel 2

Isocyanat-aktivierte FMP-Tumormittel gemäß Beispiel 1 werden mit 50 mg Mannose, die in 3 ml absolutem DMSO gelöst sind, versetzt und 6 Stunden bei 30°C umgesetzt. Das Produkt wird sodann gegen Wasser 24 Stunden dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die weitere Präparation erfolgt gemäß Beispiel 1.

Beispiel 3

PVA-gecoatetes Ferrit-Pulver gemäß Beispiel 1 wird nach der Trocknung im Vakuum über KOH mit 3 ml absolutem DMSO, in dem 3 mM 4-Dimethylaminopyridin und 2,5 mM 2-Fluor-1-methylpyridinium-toluol-4-sulfonat (FPTS) gelöst sind, versetzt und unter Schütteln bei Raumtemperatur 45 Min. aktiviert. Das umgesetzte Produkt wird anschließend wie oben beschrieben abwechselnd mit Aceton und Dimethylformamid unter Verwendung eines Magneten gereinigt und anschließend im Vakuum über KOH getrocknet. Das so gewonnene Produkt kann direkt mit AK oder anderen Tumor-Targeting vermittelnden Substanzen durch einfache Inkubation bei Raumtemperatur gekoppelt werden.

Beispiel 4

1,5 nM zuckerfreies Human-Serum-Albumin werden mit 50 ml 0,1M Phosphat-Puffer, pH 5,0, in dem 0,01M N-cyclohexyl-N'-[β-(N-methylmorpholin)-äthyl]carbodiimid-p-toluolsulfonat gelöst sind, versetzt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Produkt wird danach 30 Min. mit 4000 × g zentrifugiert, anschließend 24 Stunden gegen PBS, pH 7,0, dialysiert und schließlich lyophilisiert. Das Trockenprodukt wird in 1,5 ml 0,1M K-Phosphat-Puffer, pH 6,4, aufgenommen und mit 1,5 ml desselben Puffers, in dem 95 nM N-Acetyl-D-Galactosamin gelöst sind, versetzt. Die Kopplung geschieht unter Schütteln bei 4°C über einen Zeitraum von 18 Stunden. Danach erfolgt Zentrifugation, Dialyse und Lyophilisierung. Das gewonnene Festprodukt wird in 2 ml PBS-Puffer, pH 7,2, gelöst und anschließend mit den PVA-gecoateten und FPTS-aktivierten FMP gemäß Beispiel 3 für 15 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgen Aufarbeitung und Präparation gemäß Beispiel 1. Die Substanz ist somit gebrauchsfertig.

Beispiel 5

5 ml einer 10%igen wäßrigen Stärkelösung werden bei 95°C mit 0,1 g Ferrit-Pulver mit einer Curie-Temperatur von 45°C und einer mittleren Teilchengröße von 80 nm unter Rühren kurz vermischt und anschließend in der Hitze in 45 ml auf 80°C vorgeheiztes Olivenöl, in dem 1 ml Pluronic® PE 3100 gelöst ist, eingerührt und 55 in einem Vortex-Rührer homogenisiert. Danach wird die Suspension in einem Eisbad abgekühlt. Es fallen feste perlförmige Partikel mit einer mittleren Teilchengröße von 100 nm an, die durch abwechselndes Suspendieren in 20 ml Eiswasser und 20 ml Aceton und anschließendes Dekantieren unter Zuhilfenahme eines Magneten gereinigt werden. Diese Prozedur wird 10mal wiederholt. Das getrocknete Produkt wird sodann mit 50 mg BrCN, gelöst in 2 ml 0,1M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 11, 5 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Das aktivierte Produkt wird mehrmals mit Wasser versetzt und in üblicher Weise unter Zuhilfenahme eines Magneten gewaschen. Trocknung und anschließendes

Lyophilisieren erfolgt wie oben angegeben. Durch 12stündige Inkubation einer 3 nM Anti-CEA-IgG enthaltenden 0,1M NaHCO₃-Lösung, pH 8,5, bei 4°C werden Anti-Tumormittel erhalten, die nach den üblichen 5 Präparationsschritten gemäß Beispiel 1 für die Therapie solcher Tumore geeignet sind, die hohe CEA-Werte aufweisen.

Beispiel 6

Mit Stärke gecoatetes Ferrit-Pulver gemäß Beispiel 5 wird im Vakuum über KOH mehrere Stunden getrocknet. 20 mg Tosylchlorid und 0,4 ml Äthanolamin, gelöst in 1 ml absolutem Aceton, werden zugefügt und die Mischung 20 Min. bei 25°C geschüttelt. Danach wird mehrfach mit Aceton in üblicher Weise gewaschen. Das Produkt wird sodann mit 30 ml 0,1M Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,0, gewaschen und mit 1 ml dieses Puffers, in dem 0,5M NaCl und 0,1 mg Angiotensin II gelöst sind, versetzt. Die Kopplung erfolgt innerhalb von 12 Stunden bei 4°C. Nach Dialyse und weiterer Präparation analog Beispiel 1 ist das Produkt verwendungsfertig.

Beispiel 7

Gecoatete und mit BrCN aktivierte FMP gemäß Beispiel 5 werden mit 3 ml einer 0,1M NaHCO₃/0,5M NaCl-Lösung, pH 8,5, in der 10 µg EGF gelöst sind, inkubiert und über einen Zeitraum von 10 Stunden bei 4°C umgesetzt. Reinigung und Präparation erfolgt analog den obigen Beispielen.

Beispiel 8

0,1 g Ferrit-Pulver mit einem Curiepunkt von 45°C und einem mittleren Teilchendurchmesser von 20 nm werden mit einer PVA-Lösung analog Beispiel 1, die zusätzlich 0,1 mg Ricin enthält, in einem Ultraschallbad 10 Min. homogenisiert. Nach den üblichen Reinigungs- und Aufarbeitungsschritten werden FMP-Toxin-Kolloide mit einer mittleren Teilchengröße von 80 nm gewonnen. Das Produkt wird nach der üblichen Vakuumtrocknung mit FPTS/4-Dimethylaminopyridin gemäß Beispiel 3 aktiviert. Nach den üblichen Reinigungsschritten können in PBS-Puffer, pH 7,0, gelöste Tumor-AK oder Zell-Targeting-Substanzen an das gewonnene Produkt durch Inkubation gemäß obigen Beispielen bei Raumtemperatur gekoppelt werden.

Beispiel 9

0,1 g Ferrit-Pulver der Formel CO_{0,2}Zn_{0,8}Fe₂O₄ mit einem Curiepunkt von 45°C und einem mittleren Teilchendurchmesser von 80 nm werden auf einem 4 × 4-cm-Glas-Objektträger, der sich 2 cm oberhalb der inneren Elektrode eines herkömmlichen Glimmentladungsgerätes befindet, ausgebreitet. Reinststickstoff wird durch eine Waschflasche, die eine Mischung, bestehend aus 70% (V/V) Glycidyl-methacrylat und 30% (V/V) N-Vinylpyrrolidon, enthält, geleitet. Die Waschflasche wird konstant bei einer Temperatur von 45°C gehalten, um den Monomerpartialdruck entsprechend zu erhöhen. Vor dem Versuch wird die Plasmakammer mit der Probe 10 Min. mit dem Reaktionsgas durchspült. Während des mit 300 W Elektrodenleistung gefahrenen Versuches wird der Gasdruck während der 10minütigen Versuchsdauer konstant auf 300 Pa eingeregelt. Dieser Versuchszyklus wird 2mal wiederholt, um eine gleich-

mäßige Beschichtung der FMP zu erreichen. Nach dem Versuch werden die gecoateten FMP 3 Stunden im Ölpumpenvakuum evakuiert, um restliches Monomer zu entfernen. Danach wird das Material mehrfach abwechselnd mit Aceton und Wasser versetzt und die Lösung nach Anlegen des Magneten dekantiert. Es folgt die Trocknung im Vakuum (1300 Pa) über KOH. Das gewonnene Präparat wird anschließend mit 30 ml einer Lösung, bestehend aus je 50 Volumenteilen 0,1M Borat-NaOH-Puffer, pH 9,5, und frisch destilliertem Dimethylformamid, gewaschen. 2 ml dieser Lösung, in der 1 mg N-Acetyl-Neuraminsäure gelöst sind, werden sodann 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Restliche Epoxygruppen werden durch anschließende 20stündige Inkubation mit 0,2M Mercaptoäthanol-Lösung abgesättigt. Nach 24stündiger Dialyse gegen PBS, pH 7,0, sowie den üblichen Aufreinigungs- und Präparationsschritten gemäß Beispiel 1 kann die Substanz für die Therapie eingesetzt werden.

Beispiel 10

Ferrit-Pulver gemäß Beispiel 1 wird dem Plasma-Coating-Verfahren, wie in Beispiel 9 angegeben, unterworfen. Der Stickstoffstrom wird durch eine 50%-(V/V-)Glycidyl-methacrylat- und 50%-Hydroxyäthyl-acrylat-Lösung geleitet. Der Speisedruck beträgt 500 Pa.

Reinigung und Aufarbeitung erfolgen analog Beispiel 9. 10 mg Glucose, gelöst in 3 ml 0,1M Borat-Puffer, pH 9,5, werden 20 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden Glucose-immobilisierte Tumormittel erhalten, die, nach entsprechender Inkubation in 0,2M Mercaptoäthanol gemäß obigem Beispiel, in 3 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert werden und nach anschließender Sterilfiltration analog obigen Beispielen verwendungsfähig sind.

Beispiel 11

Ferrit-Pulver gemäß Beispiel 1 wird mit einem Plasma, das, in Abänderung der Versuchsbedingungen aus Beispiel 9, mit einer Monomierzusammensetzung, bestehend aus 80% Hydroxyäthyl-methacrylat und 20% N-Vinylpyrrolidon, gespeist wird, bei einem Druck von 150 Pa 10 Min. behandelt. Der Versuchszyklus wird 2mal wiederholt. Aufarbeitung und Reinigung erfolgen gemäß obigen Beispielen. Die Hydroxylgruppen enthaltende Matrix wird anschließend mit dem System Hexamethyldiisocyanat/DMSO analog Beispiel 1 aktiviert. Nach den üblichen Reinigungs- und Aufarbeitungsschritten wird ein Kolloid gewonnen, an das Zuckerliganden in einem Borat-Puffer, pH 9 bis 10, oder Proteine in einem 0,5–1M Kalium-Phosphat-Puffer, pH 7–8, durch einfaches Inkubieren gekoppelt werden können.

Beispiel 12

0,1 g Ferrit-Pulver mit einem Curiepunkt von 45°C und einem mittleren Teilchendurchmesser von 85 nm werden in eine Wasser-Öl-Suspension, bestehend aus 14,5% zweimal rekristallisiertem Acrylamid, 0,6% N,N'-Methylen-bis-acrylamid, 3,5% Na-Acetat, 41% Leinsamenöl, 0,2% (alle W/W) Azo-bis-isobutyronitril, gegeben und in einem Ultraschallbad (100 W) homogenisiert. Die Reaktion wird mittels einer herkömmlichen Quecksilber-Hochdrucklampe initiiert und ist nach 10 Min. beendet. Danach wird das Produkt 10 Min. bei 4000 × g zentrifugiert und anschließend 24 Stunden ge-

gen Wasser dialysiert. Das gewonnene Produkt wird mehrfach in Wasser suspendiert und nach Anlegen eines Magneten dekantiert. Die gewonnene Festphase wird gemäß Beispiel 1 für die Applikation präpariert und ist für die Behandlung von Leber- und Nierentumoren verwendbar.

Beispiel 13

0,1 g Ferrit-Pulver gemäß Beispiel 12 werden nach der Acrylamid-Beschichtung mit 3 ml einer 5%igen wäßrigen Glutaraldehyd-Lösung versetzt. Die Aktivierung erfolgt bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 2 Stunden. Das Material wird anschließend 30 Min. bei 3000 × g zentrifugiert und mehrfach mit Wasser in der üblichen Weise unter Anwendung eines Magneten gewaschen. 1 ml PBS-Puffer, pH 6,9, in dem 0,1 mg Anti-CEA-IgG1 sowie 0,5 mM NaBH₃CN gelöst sind, werden 10 Stunden bei 4°C inkubiert. Es folgen Zentrifugation und Präparation gemäß Beispiel 1. Das so gewonnene Präparat kann direkt zur Therapie eingesetzt werden.

Beispiel 14

Das Verfahren gemäß Beispiel 12 wird verwendet, um ein FMP-Toxin-Kombinationspräparat herzustellen. Dazu wird der Wasser-Öl-Suspension zusätzlich 0,05 mg Ricin zugefügt. Es entstehen so Kolloide, die für eine Langzeittherapie geeignet sind.

Beispiel 15

Acrylamid-gecoatete Partikel werden gemäß Beispiel 12 unter Verwendung von 0,1% (W/W) N,N'-Methylen-bis-acrylamid hergestellt. Weitere Präparation erfolgt gemäß Beispiel 12. Es entsteht so ein Therapeutikum, das für eine Kurzzeittherapie geeignet ist.

Beispiel 16

40 µM L-Dipalmitoyl-α-lecithin und 8,2 µM Cholesterin werden in einem 50-ml-Rundkolben in 5 ml Chloroform gelöst und anschließend im Vakuum zur Trockne eingedunstet. Nach 10stündigem Trocknen im Hochvakuum werden 3 ml physiologische Kochsalzlösung, in der 0,1 g Ferrit-Pulver gemäß Beispiel 1 und 0,012 mg Ricin suspendiert sind, zugegeben und die Mischung unter Stickstoffzuleitung 30 Min. bei 45°C homogenisiert. Danach wird die Suspension in einem Eisbad abgekühlt und bei 4°C 6 Stunden unter Stickstoff aufbewahrt. Das Produkt wird sodann mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und unter Zuhilfenahme des Magneten dekantiert. Um nicht inkorporiertes Ricin vollständig zu entfernen, wird die Suspension über eine mit physiologischer Kochsalzlösung equilibrierte Sephadex-G-50-Säule (1 × 25 cm, Fluß 0,5 ml/Stunde) geschickt. Es fallen Liposomen mit einer Teilchengröße von ca. 450 nm an, die zur Behandlung von Leber-, Nieren- und Milzcarcinomen geeignet sind.

Beispiel 17

Das Verfahren gemäß Beispiel 16 wird benutzt, um FMP-Liposomen mit negativer Ladung herzustellen. Dazu wird in Abänderung obiger Rezeptur 35 µM L-Dipalmitoyl-α-lecithin, 10,2 µM Cholesterin und 4,8 µM L-dipalmitoyl-α-phosphatid-dinatriumsalz zur Herstel-

lung der Liposomen verwendet. Die weiteren Verfahrensweisen verlaufen analog obigem Beispiel.

Beispiel 18

0,5 mg Streptavidin, gelöst in 1 ml PBS-Puffer, pH 7,2, werden durch 12stündige Inkubation bei Raumtemperatur an das gemäß Beispiel 1 mit PVA beschichtete und mit Isocyanat aktivierte Ferrit-Pulver gekoppelt. Das gewonnene Produkt wird sodann durch mehrmalige Suspension in physiologischer Kochsalzlösung und Dekantieren unter Verwendung der Magnetfeldabtrennung gereinigt. Ein Anti-EGF-Rezeptor-IgG wird in Abänderung einer bekannten Vorschrift (Int. J. Cancer, 48, 167, 1991) biotinyliert. Dazu werden 1 mg AK in 1 ml 0,1M Na-Acetat-Puffer, pH 5,5, der 12,5 mM NaJO₄ enthält, bei 4°C eine Stunde unter Lichtabschluß oxidiert. nach der Dialyse gegen denselben Puffer werden 30 mg Biotin-Hydrazid und 0,05 mg NaHB₃CN zugegeben. Die Kopplung ist nach einer weiteren Stunde bei 4°C abgeschlossen. Sodann wird der biotinylierte AK gegen PBS-Puffer, pH 7,0, 24 Stunden dialysiert; anschließend folgt Lyophilisierung. Das gewonnene Festprodukt wird in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und kann nach der Sterilfiltration direkt für die Injektion verwendet werden. Nach Absättigung der EGF-Rezeptoren mit dem biotinylierten IgG können die Streptavidin-beladenen FMP injiziert werden, die dann mit dem Biotin-IgG konjugieren.

Es folgt das Anlegen des entsprechenden Induktionsfeldes.

Patentansprüche

1. Therapeutische Mittel für die selektive Tumorthherapie, dadurch gekennzeichnet, daß ferromagnetische Partikel mit einer Curie-Temperatur zwischen 42,5 und 70°C und einer Teilchengröße von <500 nm in eine Polymer- oder Biopolymermatrix eingekapselt sind, die nicht vom reticuloendothelialen System (RES) phagozytiert werden und die mit Tumorzell-Targeting vermittelnden Wirksubstanzen koppelnde, reaktive Gruppen aufweisen.
2. Therapeutische Mittel gemäß Beispiel 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerschicht aus Stärke, Polyvinylalkohol, Polyacrylamid, Dextran, Agarose oder Gelatine besteht.
3. Therapeutische Mittel gemäß Beispiel 1, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel in Liposome (Vesikel) aus Phospholipiden, Sphingolipiden, Glykosphingolipiden, Ceramiden sowie anderen, die Zellmembran konstituierenden Substanzen oder Mischungen derselben eingekapselt sind.
4. Therapeutische Mittel gemäß Beispiel 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposome aktivierte Lipide enthalten, die mit den Tumorzell-Targeting vermittelnden Wirksubstanzen koppelnde, reaktive Gruppen aufweisen.
5. Therapeutische Mittel gemäß Beispiele 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die das Tumorzell-Targeting vermittelnden Wirksubstanzen Tumor-Antikörper, tumorassoziierte Antikörper, Antikörper-Fragmente, heterobispezifische Antikörper, Glykoproteine, Saccharide, Oligosaccharide, Neoglykoproteine, Angiotensin II, Streptavidin, Avidin, Biotin oder Epidermal Growth Faktor sind.
6. Therapeutische Mittel gemäß Beispiel 1, dadurch

gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel mit Polymeren, die in einem Plasma aus Vinylmonomeren oder einer Vinylmonomermischung gebildet werden, beschichtet sind.

7. Therapeutische Mittel gemäß Beispiele 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel zusammen mit einem Tumor-Toxin oder einer cytotoxischen Substanz in die Polymermatrix eingekapselt sind.

8. Verfahren zur Herstellung von Mitteln zur selektiven Tumorthherapie, dadurch gekennzeichnet, daß ferromagnetische Partikel mit einer Curie-Temperatur zwischen 42,5 und 70°C und einer Teilchengröße von <500 nm in eine Polymer- oder Biopolymermatrix eingekapselt werden, die nicht vom RES phagozytiert wird und auf deren Oberfläche reaktive Gruppen erzeugt werden, an die Tumor-Targeting vermittelnde Wirksubstanzen kovalent gekoppelt werden.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel mittels der Phasenseparations-Suspensionspolymerisation mit Stärke, Polyvinylalkohol, Polyacrylamid, Dextran, Agarose oder Gelatine eingekapselt werden.

10. Verfahren gemäß Beispiel 8, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel durch aus Phospholipiden, Sphingolipiden, Glykosphingolipiden, Ceramiden sowie anderen, die Zellmembran konstituierenden Substanzen oder Mischungen derselben gebildeten Liposome (Vesikel) eingekapselt werden.

11. Verfahren gemäß Beispiele 8 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß in die die ferromagnetischen Partikel einkapselnden Liposome solche Lipide eingebaut werden, an die über aktivierbare Gruppen Tumorzell-Targeting vermittelnde Wirksubstanzen kovalent gebunden werden.

12. Verfahren gemäß Beispiel 8, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel durch ein aus Monomeren oder einer Monomermischung bestehendes Plasma, das entweder durch Hochfrequenz- bzw. Radiofrequenz-Glimmentladung, Gleichstrom- und Niederfrequenz-Glimmentladung, Mikrowellenentladung oder Coronaentladung erzeugt wird, beschichtet werden.

13. Verfahren gemäß Beispiele 8, 9, 11 und 12 dadurch gekennzeichnet, daß an die reaktive Gruppen enthaltenden Polymere oder Biopolymere, mit denen die ferromagnetischen Partikel beschichtet sind, Tumor-Targeting vermittelnde Wirksubstanzen gemäß Beispiel 5 kovalent gekoppelt werden.

14. Verfahren gemäß Beispiele 8 bis 11 und 13, dadurch gekennzeichnet, daß die ferromagnetischen Partikel zusammen mit Tumor-Toxinen oder cytotoxischen Substanzen in die Polymer- oder Biopolymermatrix eingekapselt werden.

15. Verwendung von ferromagnetischen Partikeln mit einer Curie-Temperatur zwischen 42,5 und 70°C und einer Teilchengröße von <500 nm, die entweder allein oder zusammen mit Tumor-Toxinen oder cytotoxischen Substanzen in eine Polymermatrix eingekapselt sind, die nicht vom RES phagozytiert wird und an die Tumor-Targeting vermittelnden Wirksubstanzen gekoppelt sind, zur selektiven Tumorthherapie durch induktiv erzeugte Hyperthermie.

16. Verwendung von ferromagnetischen Partikeln

mit einer Curie-Temperatur zwischen 42,5 und 70°C sowie einer Teilchengröße von < 500 nm ohne Polymerbeschichtung zur selektiven Therapie der Leber oder Niere durch induktiv erzeugte Hyperthermie.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65